

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP 2004/012456

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

24.08.2004

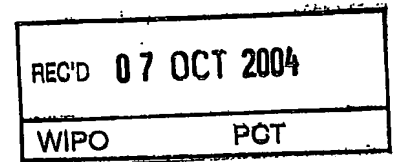
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 8月25日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-208724  
[ST. 10/C]: [JP 2003-208724]

出 願 人  
Applicant(s): 田辺製薬株式会社

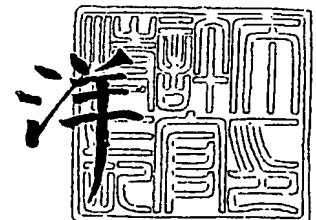


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2004-3085699

【書類名】 特許願

【整理番号】 TB-15-003

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成15年 8月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 5/00

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町緑 1 - 1 自治医大職員住宅 I -  
2 0 1

【氏名】 花園 豊

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区加賀 2 - 7 - 1 - 6 0 5

【氏名】 佐々木 京子

【特許出願人】

【識別番号】 000002956

【氏名又は名称】 田辺製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100095832

【弁理士】

【氏名又は名称】 細田 芳徳

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003-153494

【出願日】 平成15年 5月29日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050739

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

- 【物件名】 図面 1
- 【物件名】 要約書 1
- 【物件名】 発明の新規性の喪失の例外の規定の適用を受けるための  
証明書 1
- 【援用の表示】 先の出願について、平成 1 5 年 6 月 2 4 日付で提出した  
発明の新規性の喪失の例外の規定の適用を受けるための  
証明書は、変更を要しないため省略する。
- 【物件名】 事情説明書 1
- 【援用の表示】 先の出願について、平成 1 5 年 6 月 2 4 日付で提出した  
上申書に添付した事情説明書は、変更を要しないため省  
略する。
- 【包括委任状番号】 9712154
- 【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 霊長類動物の胚性幹細胞から造血系細胞への分化方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞を妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、生育させ、出生に至った仔ヒツジに、霊長類動物に特異的なサイトカインを投与し、さらに生育させて得られたヒツジから霊長類動物の造血系細胞を得ることを特徴とする、霊長類動物の胚性幹細胞から造血系細胞への分化方法。

【請求項 2】 (I) マクロファージコロニー刺激因子を欠損したストロマ細胞株をフィーダー細胞とし、該フィーダー細胞上、霊長類動物の胚性幹細胞を維持するステップ、及び

(II) 前記ステップ (I) で得られた霊長類動物由来の細胞を、妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、該胎仔を出生にいたるまで生育させるステップ、を含む、請求項 1 記載の分化方法。

【請求項 3】 ステップ (I) において、骨形成タンパク質-4 の存在下、フィーダー細胞上、霊長類動物の胚性幹細胞を維持する、請求項 2 記載の分化方法。

【請求項 4】 (I) マクロファージコロニー刺激因子を欠損したストロマ細胞株をフィーダー細胞とし、該フィーダー細胞上、霊長類動物の胚性幹細胞を維持するステップ、

(II) 前記ステップ (I) で得られた霊長類動物由来の細胞を、妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、該胎仔を出生にいたるまで生育させるステップ、及び

(III) 前記ステップ (II) で出生した仔ヒツジより、該霊長類動物の胚性幹細胞から分化した霊長類動物の造血系細胞を分離するステップを含む、霊長類動物の造血系細胞の製造方法。

【請求項 5】 請求項 4 記載の製造方法により得られる造血系細胞。

【請求項 6】 霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞を妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植することを特徴とする、霊長類動物の造血系細胞を生産するキメラヒツジの作製方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、霊長類動物の造血系細胞、分化細胞等の供給のための技術に関する。より詳しくは、本発明は、霊長類動物の胚性幹細胞から造血系細胞への分化方法、該分化方法により得られる造血系細胞、霊長類動物の造血系細胞を生産するキメラヒツジの作製方法、霊長類動物の分化細胞を生産するキメラヒツジの作製方法、並びに霊長類動物の分化細胞の製造方法に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

再生不良性白血病等の疾患の患者に対して、骨髓移植、末梢血幹細胞移植、臍帯血幹細胞移植等に代表される造血幹細胞移植を行ない、患者の体内において、血液細胞を産生させることが行なわれている。

**【0003】**

しかしながら、前記造血幹細胞移植においては、移植対象の患者に適合する造血幹細胞の安定供給が困難であること、造血幹細胞の採取の際、ドナーに体力的又は肉体的にダメージを与える場合があること等の欠点がある。

**【0004】**

そこで、造血幹細胞の安定供給を図るため、ブタ胎仔に経子宮的にヒト造血幹細胞に移植し、ブタ体内で造血前駆細胞を増幅させることが試みられている（非特許文献1）。

**【0005】**

一方、機能障害を有する組織や臓器の機能回復、修復、再生等を目的とする再生医療への応用のため、胚性幹細胞（以下、ES細胞ともいう）の分化について、イン・ビトロでの研究が行なわれている。

**【0006】**

胚性幹細胞から血液細胞へのイン・ビトロでの分化の試みの例として、造血幹細胞の自己再生に関連するホメオティックセレクター遺伝子であるHoxB4を導入したマウスES細胞から、最終造血幹細胞の表現型を示す細胞へ分化させる

こと（非特許文献2）、OP9ストロマ細胞を利用して、マウスES細胞から、造血前駆細胞と推定される細胞へ分化させること（非特許文献3、非特許文献4）、アカゲザルES細胞を、マウスS17ストロマ細胞上で培養して、造血幹細胞に分化させること（非特許文献5）、マウスES細胞から造血前駆細胞へ分化させること（非特許文献6）が挙げられる。

#### 【0007】

また、前記非特許文献5には、骨形成タンパク質-4（BMP-4）存在下で、アカゲザルES細胞を培養することにより、BMP-4非存在下の場合に比べ、造血幹細胞の分化が15倍に増加することが開示されている。さらに、前記非特許文献6には、BMP-4存在下で、マウスES細胞を培養することにより、BMP-4非存在下の場合に比べ、造血前駆細胞の分化が増加することが開示されている。

#### 【0008】

しかしながら、一般的に、発生の初期に出現する細胞（神経細胞、心筋細胞、胎児造血細胞等）については、イン・ビトロでの分化に比べ、造血幹細胞、肝細胞、脾臓β細胞等の発生の後期に「場」誘導的に出現する細胞は、前記ES細胞からの分化が困難であるという欠点がある。

#### 【0009】

また、非特許文献2に記載の分化方法では、ES細胞に、造血幹細胞の自己再生に関連するHoxB4を導入されたES細胞が用いられるため、得られた造血幹細胞の適用範囲が限定される場合があるという欠点がある。

#### 【0010】

さらに、非特許文献3及び4に記載の分化方法では、OP9ストロマ細胞が用いられるため、実際には、卵黄嚢造血（一次造血）が再現されるにとどまるものと考えられ、造血系を再構築しうる造血幹細胞の分化の誘導は困難であるという欠点がある。

#### 【0011】

##### 【非特許文献1】

中内啓光、他1名、“3. ヒト血液キメラブタの樹立とその応用”、

「第117回日本医学会シンポジウム記録集 幹細胞と細胞療法－[III]組織・器官幹細胞：臨床応用への基盤開発（2） 2000年8月4日～6日開催、p 99－106 [online]、インターネット<URL:<http://www.med.or.jp/jams/symposium/kiroku/117/pdf/117099.pdf>>

【非特許文献2】

マイケル カイバ (Michael Kyba) ら、Cell、第109巻、2002年4月5日発行、p 29－37

【非特許文献3】

仲野徹著、“5. 胚性幹細胞からの血液細胞への分化”、横田崇ら編、実験医学 増刊「幹細胞研究の最前線と再生医療への応用 発生・分化メカニズムの解明、そして臨床へ」 2001年9月25日発行、第19巻、第15号、p 1966－1971

【非特許文献4】

仲野徹 (Toru Nakano) ら、Science、第265巻、1994年8月19日、p 1098－1101

【非特許文献5】

フェイ リ (Fei Li) ら、Blood、第98巻、2001年7月15日発行、p 335－342

【非特許文献6】

ブリット エム. ヨハンソン (Britt M. Johansson) ら、Molecular and Cellular Biology、第15巻、第1号、1995年1月発行、p 141－151

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、霊長類の造血系細胞を安定に供給すること、霊長類動物の胚性幹細胞への外来遺伝子の導入等の遺伝子工学的操作を行なうことなく、該霊長類動物の胚性幹細胞を造血系細胞に分化させること等の少なくとも1つを可能にする、霊長類動物の胚性幹細胞からの造血系細胞への分化方法を提供することを目的とする。また、本発明は、霊長類の造血系細胞を安定に供給すること、霊長類の造

血系細胞を大量に供給すること、霊長類動物の輸血用血小板を安定に供給すること、霊長類動物の移植用のCD34+細胞を安定に供給すること等の少なくとも1つを可能にする、霊長類動物の造血系細胞の製造方法を提供することを目的とする。さらに、本発明は、前記製造方法により得られた造血系細胞を提供することを目的とする。また、本発明は、霊長類の造血系細胞を安定に供給することができる、キメラヒツジの作製方法を提供することを目的とする。

### 【0013】

#### 【課題を解決するための手段】

即ち、本発明の要旨は、

〔1〕 霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞を妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、生育させ、出生に至った仔ヒツジに、霊長類動物に特異的なサイトカインを投与し、さらに生育させて得られたヒツジから霊長類動物の造血系細胞を得ることを特徴とする、霊長類動物の胚性幹細胞から造血系細胞への分化方法、

〔2〕 (I) マクロファージコロニー刺激因子を欠損したストロマ細胞株をフィーダー細胞とし、該フィーダー細胞上、霊長類動物の胚性幹細胞を維持するステップ、及び

(II) 前記ステップ(I)で得られた霊長類動物由来の細胞を、妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、該胎仔を出生にいたるまで生育させるステップ、を含む、前記〔1〕記載の分化方法、

〔3〕 ステップ(I)において、骨形成タンパク質-4の存在下、フィーダー細胞上、霊長類動物の胚性幹細胞を維持する、前記〔2〕記載の分化方法、

〔4〕 (I) マクロファージコロニー刺激因子を欠損したストロマ細胞株をフィーダー細胞とし、該フィーダー細胞上、霊長類動物の胚性幹細胞を維持するステップ、

(II) 前記ステップ(I)で得られた霊長類動物由来の細胞を、妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、該胎仔を出生にいたるまで生育させるステップ、及び

(III) 前記ステップ(II)で出生した仔ヒツジより、該霊長類動物の胚性幹細胞から分化した霊長類動物の造血系細胞を分離するステップ



を含む、霊長類動物の造血系細胞の製造方法、

〔5〕 前記〔4〕記載の製造方法により得られる造血系細胞、並びに

〔6〕 霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞を妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植することを特徴とする、霊長類動物の造血系細胞を生産するキメラヒツジの作製方法、  
に関する。

#### 【0014】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導条件で処理し、得られた細胞を、妊娠ヒツジの子宮内のヒツジ胎仔に移植することにより、出生後のヒツジ胎仔、すなわち、より厳密には、仔ヒツジが、本質的にサル由来の造血系細胞を生産するという本発明者らの驚くべき知見に基づく。

#### 【0015】

本発明の霊長類動物の胚性幹細胞から造血系細胞への分化方法は、霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞を妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、ついで、生まれたヒツジ胎仔から霊長類動物の造血系細胞を得ることを特徴とする方法である。

#### 【0016】

本発明の霊長類動物の胚性幹細胞から造血系細胞への分化方法は、より好ましくは、霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞を妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、生育させ、出生に至った仔ヒツジに、霊長類動物に特異的なサイトカインを投与し、さらに生育させて得られたヒツジから霊長類動物の造血系細胞を得ることを特徴とする方法である。

#### 【0017】

本発明の分化方法は、霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件（以下、造血系分化誘導条件ともいう）で維持することに1つの大きな特徴がある。

#### 【0018】

本発明の分化方法においては、霊長類動物の胚性幹細胞を、前記造血系分化誘

導条件に維持するため、未分化胚性幹細胞をそのまま移植しても、該未分化胚性幹細胞から造血系細胞への分化が実質的に起こらないにもかかわらず、驚くべく、該霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞に分化させることができるという優れた効果を発揮する。

#### 【0019】

また、本発明の分化方法においては、霊長類動物の胚性幹細胞が、前記造血系分化誘導条件に維持されるため、該霊長類動物の胚性幹細胞は、ヒツジ胎仔へ移植された際、該ヒツジ胎仔〔厳密には、出生後においては、出生した仔ヒツジ（以下、本明細書においては、「出生仔ヒツジ」とも表記する）〕の体内環境をより有効に利用して、分化することができるという優れた効果を発揮する。

#### 【0020】

さらに、本発明の分化方法は、霊長類動物の胚性幹細胞を造血系細胞に分化させるために、該霊長類動物の胚性幹細胞に、分化を惹起する外来遺伝子（例えば、ホメオティックセレクター遺伝子）の導入等の遺伝子工学的操作を施すことが実質的に要求されない点で有利である。したがって、本発明の分化方法は、高度な技術や高価な機械、試薬等を必要とせず、移植用の細胞、組織の供給等に有用である。

#### 【0021】

また、本発明の分化方法は、妊娠ヒツジの子宮内のヒツジ胎仔が用いられることにも1つの大きな特徴がある。

#### 【0022】

本発明の分化方法は、前記ヒツジ胎仔が用いられているため、霊長類動物の胚性幹細胞を前記造血系分化誘導条件に維持して得られた細胞を、驚くべく、本質的に霊長類動物に由来する造血系細胞に分化させることができるという優れた効果を発揮する。

#### 【0023】

また、本発明の分化方法によれば、前記ヒツジ胎仔が用いられているため、霊長類とのキメラ率が高くなるという優れた効果を得ることができる。したがって、本発明の分化方法によれば、より効率よく、ヒツジ体内で、本質的に霊長類動

物に由来する造血系細胞を得ることができるという優れた効果が発揮される。

【0024】

さらに、本発明の分化方法によれば、妊娠ヒツジの子宮内のヒツジ胎仔が用いられているため、出生後に、霊長類動物の胚性幹細胞を、さらに移植することができるという優れた特徴を有する。したがって、本発明の分化方法によれば、本質的に霊長類動物に由来する造血系細胞を、より効率よく、安定して供給することができる。

【0025】

本発明の分化方法は、霊長類動物の胚性幹細胞を、前記造血系分化誘導条件に維持して得られた細胞を、妊娠ヒツジの子宮内のヒツジ胎仔に移植することにも1つの大きな特徴がある。

【0026】

本発明の分化方法は、霊長類動物の胚性幹細胞を、前記造血系分化誘導条件に維持して得られた細胞を、妊娠ヒツジの子宮内のヒツジ胎仔に移植するため、霊長類動物に由来する造血系細胞を、効率よく、安定して供給することができる。さらに、本発明の分化方法は、霊長類動物の胚性幹細胞を、前記造血系分化誘導条件に維持して得られた細胞を、妊娠ヒツジの子宮内のヒツジ胎仔に移植するため、ヒツジに対しては、作用しない霊長類のサイトカインにより、移植された霊長類動物の胚性幹細胞又は本質的に霊長類動物に由来する造血系細胞を選択的に刺激することができるという優れた効果を発揮する。したがって、霊長類動物に由来する造血系細胞を、より効率よく、安定して供給することができる。さらに、本発明の分化方法においては、造血系分化誘導条件下に、6日～8日間、好ましくは、6日間維持した細胞を用いることにより、驚くべく、高効率でキメラ動物を得ることができ、驚くべく高いキメラ率を達成することができるという優れた効果を発揮する。

【0027】

本明細書において、霊長類動物とは、ヒト、サル等をいう。前記サルとしては、例えば、カニクイザル、アカゲザル、ニホンザル、マーモセット等が挙げられる。

## 【0028】

本明細書において、胚性幹細胞（以下、ES細胞ともいう）とは、多分化能と自己複製能とを有する未分化細胞をいう。

## 【0029】

本発明の分化方法に用いられる霊長類動物の胚性幹細胞としては、具体的には、例えば、CMK 6 細胞等が挙げられる。

## 【0030】

かかる胚性幹細胞は、例えば、フィーダー細胞として、マウス胚繊維芽細胞等の細胞であって、分裂増殖を停止させた細胞を用い、ES細胞用培地で培養することにより維持及び供給されうる。

## 【0031】

前記ES細胞用培地としては、胚性幹細胞の種類により、該胚性幹細胞に適した培地であればよい。具体的には、例えば、カニクイザル由来胚性幹細胞株CMK 6 の場合、200 ml あたりの組成として、DMEM/F12 163 ml、ウシ胎仔血清 30 ml（最終濃度15%）、L-グルタミン 2 ml（最終濃度2 mM）、ペニシリン（100 U/ml）ーstreptomycin（100  $\mu$ g/ml） 2 ml、非必須アミノ酸溶液 2 ml、2-メルカプトエタノール 1 ml（最終濃度0.1 mM）を含む培地が挙げられる。

## 【0032】

前記胚性幹細胞の未分化状態の維持及び増殖は、胚性幹細胞の種類により異なるが、例えば、白血病阻害因子（LIF）の存在等の条件に培養することにより行なわれうる。

## 【0033】

また、前記胚性幹細胞の未分化状態の維持及び増殖のための培養条件としては、胚性幹細胞の種類により異なるが、例えば、5% CO<sub>2</sub>の気相で、36～38℃、好ましくは、37℃で維持すること等が挙げられる。

## 【0034】

前記胚性幹細胞の未分化状態の維持及び増殖のために用いられる前記フィーダー細胞は、細胞の種類により異なるが、例えば、D10 培地等で維持、増殖等を

行なうことができる。

【0035】

前記フィーダー細胞の培養条件は、細胞の種類により異なるが、例えば、5% CO<sub>2</sub>の気相で、36～38℃、好ましくは、37℃で維持すること等が挙げられる。

【0036】

本明細書において、造血系細胞としては、例えば、造血幹細胞及び該造血幹細胞から分化してできる細胞群、すなわち、赤芽球、骨髓球、巨核球系、リンパ球等の性質を有する細胞が挙げられ、具体的には、赤芽球、骨髓球等が挙げられる。

【0037】

本発明において、造血系細胞の分化誘導に適した条件、すなわち、造血系分化誘導条件とは、例えば、I V型コラーゲンの存在下に培養する条件、 $\alpha$ -最小必須培地 ( $\alpha$ -MEM) 等の存在下に培養する条件、造血系分化に適したフィーダー細胞上で培養する条件、胚葉体作成後、ディッシュに接着させる条件等の種々の条件及びこれらのいずれかの組み合わせの条件等が挙げられる。

【0038】

本発明において、「霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞」は、造血コロニー形成能及び表面マーカーの発現を評価した場合、いずれも陰性となる分化段階の細胞である。かかる細胞は、いわゆる中胚葉細胞若しくは該中胚葉細胞の状態、性質等に近い細胞であってもよい。具体的には、カニクイザル由来胚性幹細胞株CMK6を造血系細胞の分化誘導に適した条件で約6日間維持して得られた細胞等が挙げられる。

【0039】

前記造血コロニー形成能は、例えば、後述のコロニーアッセイ等により評価されうる。

【0040】

前記表面マーカーとしては、CD45、TER119、 $\alpha$ <sub>4</sub>-インテグリン、VE-カドヘリン、Sc a-1、CD34、CD13、CD14、GP11b/II

Ia、CD3、CD4、CD8、sIgM、CD19等が挙げられる。

#### 【0041】

造血系分化誘導条件に維持する際に用いられるフィーダー細胞としては、マクロファージ刺激因子を欠損したストロマ細胞株が挙げられ、マクロファージ刺激因子を欠損したマウス骨髓細胞株、マクロファージ刺激因子を欠損したマウス卵黄囊細胞株等をマイトマイシンC処理又はX線処理して得られた細胞等が挙げられる。前記マクロファージ刺激因子を欠損したストロマ細胞株としては、OP9細胞株、前記マウス骨髓細胞株としては、S17細胞株〔コリンズ (Collins) ら、J. Immunol.、1987年発行、第138巻、p1082-1087〕、前記マウス卵黄囊細胞株としては、C166細胞株〔ワン (Wang) ら、In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.、1996年発行、第32巻、p292-299〕等が挙げられる。

#### 【0042】

造血系分化誘導条件に維持する際に用いられる前記フィーダー細胞は、例えば、MEM培地 (Minimum Essential medium Eagle) を用いて、ゼラチンコートした培養容器に播種すること等により作製される。フィーダー細胞は、培養容器を隙間無く覆う程度まで播種すればよい。

#### 【0043】

前記フィーダー細胞の培養条件は、用いられる細胞の種類により異なるが、ストロマ細胞株OP9細胞の場合、例えば、5% CO<sub>2</sub>の気相で、好ましくは、36~38℃、特に好ましくは、37℃で維持すること等が挙げられる。

#### 【0044】

造血系分化誘導条件に維持する際に用いられるフィーダー細胞は、具体的には、OP9細胞をフィーダー細胞として用いる場合、

ー OP9細胞用培地 {例えば、1250mlあたりの組成: α-MEM〔ギブコ (Gibco) 社製、カタログ番号: 12000-022〕 980ml、ウシ胎仔血清 250ml (最終濃度20%)、ペニシリン (100U/ml) - ストレプトマイシン (100μg/ml) 10ml、200mM L-グルタミン溶液 10ml} で、37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下で培養し、

- ー 培養液内で接着してコンフルエント又はその直前まで生育した細胞を、リン酸緩衝化生理食塩水で2回洗浄し、
- ー 洗浄後のディッシュ上の細胞をトリプシンにて処理し、
- ー 前記OP9細胞用培地を添加して、細胞を含む培地を回収し、
- ー 得られた細胞を、前記OP細胞用培地に、1：4～5で継代し、
- ー 37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下に、コンフルエントになるまで培養し、
- ー 得られた細胞を、マイトマイシンCで不活化させ、
- ー 得られた細胞（例えば、 $1 \times 10^5$ 細胞/ml）を、ゼラチンコートした培養ディッシュ上、前記OP9細胞用培地に播種し、培養することにより得られうる。

#### 【0045】

本発明に用いられる妊娠ヒツジは、安全性、例えば、流産を予防する観点から、妊娠後40日以上、好ましくは、50日以上、より好ましくは、60日以上であり、免疫拒絶を減少させ、移植細胞の生着率を十分に得る観点から、妊娠後85日以下、好ましくは、75日以下、より好ましくは、60日以下であることが望ましい。したがって、子宮内の胎仔は、妊娠50～80日であることが望ましい。

#### 【0046】

本発明の分化方法としては、より具体的には、

(I) マクロファージコロニー刺激因子を欠損したストロマ細胞株をフィーダー細胞とし、該フィーダー細胞上、霊長類動物の胚性幹細胞を維持するステップ、及び

(II) 前記ステップ(I)で得られた霊長類動物由来の細胞を、妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、該胎仔を出生にいたるまで生育させるステップ、を含む方法が挙げられる。

#### 【0047】

前記ステップ(I)において、霊長類動物の胚性幹細胞は、より分化させる観点から、密度が高くなるように播種することが望ましい。

#### 【0048】

前記ステップ（I）において、フィーダー細胞上、霊長類動物の胚性幹細胞に応じた培地で培養されることが望ましい。

【0049】

なお、培養中、培地は、適宜交換すればよい。

【0050】

また、前記ステップ（I）において、フィーダー細胞上、霊長類動物の胚性幹細胞は、5% CO<sub>2</sub>の気相で、好ましくは、36～38℃、特に好ましくは、37℃で維持することが望ましい。

【0051】

具体的には、例えば、カニクイザル胚性幹細胞株CMK6の場合、分化用培地〔100mlあたりの組成：IMDM（Iscove's Modified Dulbecco's Medium） 84ml、8% ウマ血清 8ml、8% ウシ胎仔血清 8ml、 $5 \times 10^{-6}$ M ヒドロコルチゾン 0.18μg、BMP-4 2μg（最終濃度20ng/ml）、SCF 2μg（最終濃度20ng/ml）、IL-3 2μg（最終濃度20ng/ml）、IL-6 1μg（最終濃度10ng/ml）、VEGF 2μg（最終濃度20ng/ml）、G-CSF 2μg（最終濃度20ng/ml）、Flt. 3リガンド 2μg（最終濃度10ng/ml）、EPO 200U（2U/ml）〕 5mlに懸濁し、得られた細胞懸濁液を、フィーダー細胞上に  $5 \times 10^5$ 細胞に対し、適切な量の細胞播種し、その後、37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下で6日間培養する条件が挙げられる。

【0052】

前記ステップ（I）を行なうことにより得られた細胞は、前記「霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞」に該当する。

【0053】

なお、より高効率でキメラヒツジを得る観点、より高いキメラ率を得る観点等から、前記ステップ（I）においては、胚性幹細胞、例えば、カニクイザル胚性幹細胞株CMK6等は、6日～8日、好ましくは6日間、造血系細胞の分化誘導



に適した条件で維持することが望ましい。また、これにより、胚性幹細胞から造血系細胞への分化を驚くべく高効率で、より迅速に行なうことが可能になる。

#### 【0054】

ステップ (I) において、より効率よく造血系細胞を得る観点から、好ましくは、前記造血系分化誘導条件に加え、骨形成タンパク質-4 の存在下、フィーダー細胞上、白血病阻害因子非存在下に霊長類動物の胚性幹細胞を維持することが望ましい。

#### 【0055】

前記ステップ (I) を行なうことにより得られた細胞を、ついで、妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、該胎仔を出生にいたるまで生育させる〔ステップ (II) 〕。

#### 【0056】

移植に用いられる細胞は、トリプシンで処理し、例えば、0.1% BSA (ウシ血清アルブミン) / HBSS (ハンクス平衡塩水溶液) に、生着率、キメラ率等を向上させる観点から、例えば、 $1 \times 10^6$  細胞以上、好ましくは、 $1 \times 10^6$  細胞～ $1 \times 10^9$  細胞、好ましくは、 $1 \times 10^7$  細胞～ $1 \times 10^9$  細胞となるように懸濁することにより調製されうる。

#### 【0057】

ステップ (II) において、胎仔への細胞の移植は、例えば、肝臓内、肝実質内、腹腔内、心臓内、臍帯内等に移植用細胞を穿刺注入すること等により行なわれる。

#### 【0058】

移植手術は、例えば、

- ー 妊娠約 60 日目の妊娠ヒツジを、予め、移植の 1 週間～10 日前に、移植時における飼育環境に慣れさせ、
- ー ヒツジ母体を麻酔し、
- ー ヒツジを、施術するに適切な体位に固定し、
- ー 清潔操作で、移植箇所への移植用細胞の移植を容易にするように、種々の手術、例えば、腹腔内又は肝実質内に細胞を移植する場合、下腹部正中切開で開腹

後、子宮母体腹腔外に翻転させること  
等により行なわれうる。

#### 【0059】

腹腔内へ細胞を移植する場合、例えば、ヒツジの子宮筋層を切開し、温存したまま露出させた卵膜内にヒツジ胎仔を追い込み、透明な卵膜を通して直視下に胎仔腹腔内に移植用細胞を穿刺注入し、子宮筋層、腹膜筋層、皮膚を層々に縫合閉腹すればよい。また、肝実質内へ細胞を移植する場合、子宮壁上から超音波ガイド下、ヒツジ胎仔の肝実質内に、移植用細胞を穿刺注入し、腹膜筋層、皮膚を層々に縫合閉腹すればよい。

#### 【0060】

ステップ (II) において、移植手術の施術後、妊娠ヒツジは、出生までの間、例えば、通常の飼育と同様の条件下、飼育される。

#### 【0061】

ステップ (II) で得られたヒツジ胎仔、すなわち、厳密には、出生仔ヒツジが、本質的に霊長類に由来する造血系細胞を産生していることは、ヒツジ胎仔（すなわち、厳密には、出生後には、出生仔ヒツジ）より、適切な組織、例えば、肝臓、骨髓等の組織を採取し、初代培養用の細胞を得、得られた細胞について、（1）造血コロニーアッセイを行なうこと、（2）前記（1）で形成された造血コロニーについて、霊長類動物に特異的なマーカー遺伝子の発現を調べることにより、評価されうる。

#### 【0062】

前記（1）の造血コロニーアッセイは、例えば、

- ① ヒツジ胎仔（すなわち、厳密には、出生後には、出生仔ヒツジ）より、肝臓の組織生検、骨髓等の組織を得、
- ② 得られた組織について、トリプシン処理、DNase I 処理、溶解処理等の組織に応じた適切な処理を行ない、細胞を得、
- ③ 得られた細胞を、2% FBS（ウシ胎仔血清）-IMDMに懸濁して、細胞浮遊液を得、
- ④ 得られた細胞浮遊液と、MeC培地（例えば、商品名：MethoCult

GF+〔ステムセルテクノロジーズ (StemCell Technologies) 社製、カタログ番号：ST-04435〕等〕とを混合して、攪拌し、  
⑤ ついで、得られた細胞を含む培地を、ディッシュの中央に注入し、37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下で14日間インキュベーションすることにより行なわれる。

#### 【0063】

また、前記(2)の霊長類動物に特異的なマーカー遺伝子の発現は、造血コロニーアッセイで形成されたコロニーから、慣用の方法でDNAを抽出し、得られたDNAについて、例えば、霊長類動物に特異的なマーカー遺伝子に特異的なプローブを用いたハイブリダイゼーション、特異的なプライマー対を用いたPCR等により、該遺伝子を検出することにより、評価されうる。

#### 【0064】

なお、本発明の分化方法においては、前記ステップ(II)で得られたヒツジ胎仔、すなわち、より厳密には、出生仔ヒツジに、ステップ(I)で得られた細胞をさらに移植してもよい。ステップ(I)で得られた細胞をさらに移植することにより、霊長類の造血系細胞を、効率よく、安定に供給することができる。

#### 【0065】

また、本発明の分化方法においては、前記ステップ(II)で得られた出生仔ヒツジに、霊長類動物に特異的なサイトカイン等を投与してもよい。サイトカインを仔ヒツジに投与することにより、当該出生仔ヒツジの体内において、本質的に霊長類に由来する造血系細胞への分化を選択的に刺激することが可能になる。

#### 【0066】

前記サイトカインとしては、幹細胞因子(SCF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、オンコステインM(OSM)、flk2/flk3リガンド、インターロイキン-1、インターロイキン-3、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、ケモカイン、エリスロポエチン、トロンボポエチン等及びこれらのいずれかの組み合わせが挙げられる。

#### 【0067】

本発明の分化方法においては、造血系細胞の分化誘導に適した条件下に、6日

～8日間、好ましくは、6日間維持し、得られた細胞を妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、生育させ、出生に至った仔ヒツジに、霊長類動物に特異的なサイトカインを投与することにより、驚くべく、高いキメラ率を達成するという優れた効果を発揮する。

#### 【0068】

本発明の分化方法により得られる霊長類動物の造血系細胞の評価は、例えば、CD45、TER119、 $\alpha_4$ -インテグリン、VE-カドヘリン、c-Kit、Scal、CD34（幹細胞マーカー）、CD13（骨髄球マーカー）、CD14（骨髄球マーカー）、GpIIb/IIIa（巨核球系マーカー）、CD3（T細胞マーカー）、CD4（T細胞マーカー）、CD8（T細胞マーカー）、sIgM（B細胞マーカー）、CD19（B細胞マーカー）等の発現の有無を指標とすることにより行なわれうる。

#### 【0069】

本発明の分化方法は、霊長類動物の造血系細胞の製造に用いられる。したがって、本発明により、霊長類動物の造血系細胞の製造方法が提供される。

#### 【0070】

本発明の霊長類動物の造血系細胞の製造方法は、

(I) マクロファージコロニー刺激因子を欠損したストロマ細胞株をフィーダー細胞とし、該フィーダー細胞上、霊長類動物の胚性幹細胞を維持するステップ、  
(II) 前記ステップ(I)で得られた霊長類動物由来の細胞を、妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、該胎仔を出生にいたるまで生育させるステップ、及び  
(III) 前記ステップ(II)で出生した胎仔、すなわち、より厳密には、仔ヒツジより、該霊長類動物の胚性幹細胞から分化した霊長類動物の造血系細胞を分離するステップ  
を含む方法である。

#### 【0071】

本発明の製造方法は、霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系分化誘導条件で維持することに1つの大きな特徴がある。したがって、本発明の製造方法によれば、霊長類動物の胚性幹細胞を、前記造血系分化誘導条件に維持するため、未分化胚

性幹細胞をそのまま移植しても、該未分化胚性幹細胞から造血系細胞への分化が実質的に起こらないにもかかわらず、驚くべく、該霊長類動物の胚性幹細胞から造血系細胞を製造することができるという優れた効果を発揮する。

#### 【0072】

また、本発明の分化方法においては、霊長類動物の胚性幹細胞が、ヒツジ胎仔へ移植された際、該胚性幹細胞に、該ヒツジ胎仔（すなわち、厳密には、出生後においては、出生仔ヒツジ）の体内環境をより有効に利用させることができるため、霊長類動物の造血系細胞を安定に供給することができるという優れた効果を発揮する。

#### 【0073】

また、本発明の製造方法は、妊娠ヒツジの子宮内のヒツジ胎仔が用いられることにも1つの大きな特徴がある。

#### 【0074】

本発明の製造方法は、前記ヒツジ胎仔が用いられているため、霊長類とのキメラ率が高くなり、それにより、霊長類動物の胚性幹細胞から、霊長類動物の造血系細胞を霊長類の造血系細胞を大量に供給することができるという優れた効果を発揮する。

また、本発明の製造方法によれば、前記ステップ（I）においては、胚性幹細胞、例えば、カニクイザル胚性幹細胞株CMK6等は、6日～8日、好ましくは6日間、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持することにより、胚性幹細胞から造血系細胞への分化を驚くべく高効率で、より迅速に行なうことが可能になる。

#### 【0075】

さらに、本発明の製造方法によれば、出生後に、霊長類胚性幹細胞を、さらに移植することができ、また、ヒツジに対しては、作用しない霊長類のサイトカインにより、移植された霊長類胚性幹細胞又は本質的に霊長類動物に由来する造血系細胞を選択的に刺激することができるため、本質的に霊長類動物に由来する造血系細胞を、より効率よく、安定して供給することができる。

#### 【0076】

また、本発明の製造方法によれば、輸血用血小板、移植用CD34+細胞を、安定して供給することができる。

#### 【0077】

本発明の製造方法における前記ステップ（I）及びステップ（II）は、本発明の分化方法におけるステップ（I）及びステップ（II）と同様である。

#### 【0078】

前記ステップ（III）においては、前記ステップ（II）で出生した胎仔、すなわち、仔ヒツジより、該霊長類動物の胚性幹細胞から分化した霊長類動物の造血系細胞を分離する。

#### 【0079】

ステップ（III）においては、ヒツジ胎仔、すなわち、仔ヒツジは、キメラ率の観点から、出生後、できる限り早期の個体であることが望ましい。

#### 【0080】

また、前記分化方法の場合と同様に、霊長類の造血系細胞を、効率よく、安定に供給する観点から、前記ステップ（II）で出生したヒツジ胎仔、すなわち、出生仔ヒツジに、ステップ（I）で得られた細胞をさらに移植してもよく、霊長類動物に特異的な前記サイトカイン等を投与してもよい。

#### 【0081】

ステップ（III）において、霊長類動物の造血系細胞の分離は、例えば、

- 1) ヒツジ胎仔、すなわち、仔ヒツジから、肝臓、骨髄、血液（末梢血、臍帯血）、胸腺、脾臓等を採取し、
- 2) 得られた器官から、適切な手法により、細胞群を得、
- 3) 得られた細胞群から、霊長類動物に由来する造血系細胞を分離すること等により得られうる。

#### 【0082】

前記ステップ3）においては、例えば、霊長類動物に特異的なマーカー又は該マーカーに対する抗体等を用いたフローサイトメトリー、イムノビーズを用いる方法等が行なわれる。

#### 【0083】

前記「霊長類動物に特異的なマーカー」としては、例えば、霊長類に交叉し、ヒツジに交叉しないマーカーであればよく、HLA-ABC、 $\beta$ 2-ミクログロブリン、CD45等が挙げられる。

【0084】

本発明の製造方法により得られる霊長類動物の造血系細胞の評価は、前記分化方法と同様に、例えば、CD45、TER119、 $\alpha$ 4-インテグリン、VE-カドヘリン、c-kit、Sca-1、CD34、CD13、CD14、GPIIb/IIIa、CD3、CD4、CD8、sIgM、CD19等の発現の有無を指標とすることにより行なわれうる。

【0085】

なお、本発明の製造方法により得られた霊長類動物の造血系細胞も本発明に含まれる。かかる造血系細胞は、特に限定されないが、例えば、血管新生療法用の移植材料等の用途が期待され、心筋梗塞等の虚血性疾患への応用が可能となる。

【0086】

また、本発明の分化方法と同様の操作により、霊長類動物の造血系細胞を生産するキメラヒツジを作製することができる。したがって、霊長類動物の造血系細胞を生産するキメラヒツジの作製方法も本発明に含まれる。

【0087】

本発明の霊長類動物の造血系細胞を生産するキメラヒツジの作製方法は、霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞を妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植することを1つの大きな特徴とする。造血系細胞の分化誘導に適した条件下に、6日～8日間、好ましくは、6日間維持し、得られた細胞を妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、生育させ、出生に至った仔ヒツジに、霊長類動物に特異的なサイトカインを投与することにより、驚くべく、高効率でキメラヒツジを得ることができるという優れた効果を発揮する。

【0088】

本発明のキメラヒツジの作製方法によれば、霊長類の造血系細胞をより安定に供給することができるキメラヒツジを得ることができる。

【0089】

本発明のキメラヒツジの作製方法により得られたキメラヒツジは、免疫的に寛容な状態で、本質的に霊長類動物に由来する細胞を有しているため、該キメラヒツジには、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞をさらに移植することができる。また、本発明のキメラヒツジの作製方法により得られたキメラヒツジは、霊長類動物に特異的なサイトカインを投与することにより、体内において、本質的に霊長類に由来する造血系細胞への分化を選択的に刺激することができる。

#### 【0090】

##### 【実施例】

以下、実施例により、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明は、かかる実施例によりなんら限定されるものではない。なお、以下の実施例において、「%」は、特に明記がない場合は、重量%を示すものとする。また、CO<sub>2</sub>、O<sub>2</sub>及びN<sub>2</sub>における「%」表記は、体積%を示すものとする。

#### 【0091】

##### 実施例1 サル胚性幹細胞の培養

###### (1) フィーダー細胞の作製

継代5回までのマウス胚繊維芽細胞BALB/cAJcl (H2抗原のハプロタイプH-2d) (日本クレア社供給) を、最終濃度 10 µg/ml のマイトマイシンCを含むD10培地〔組成: 10% FCS、DMEM〕で2~4時間培養することにより、細胞の分裂増殖を停止させて、不活化させた。ついで、マイトマイシンCを含む培地を除去した。処理後の細胞をリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄した。洗浄後の細胞をトリプシン・EDTA処理 (0.05% トリプシン、1mM EDTA) して、細胞浮遊液を得、ついで、細胞浮遊液を遠心分離して細胞を得た。

#### 【0092】

ついで、得られた細胞をD10培地に懸濁し、ゼラチンコートした6cm培養ディッシュ〔ファルコン (FALCON) 社製、商品名: Tissue culture dish〕に1×10<sup>6</sup>個となるように播種した。ディッシュに接着するまで培養して得られた細胞を、フィーダー細胞として用いた。



## 【0093】

## (2) カニクイザル由来ES細胞株CMK6の培養

前記実施例1(1)のフィーダー細胞の培養物より、D10培地を除去し、リン酸緩衝化生理食塩水で、該フィーダー細胞を洗浄した。

## 【0094】

ついで、凍結保存されていたカニクイザル由来ES細胞CMK6を、ES細胞用培地〔200mlあたりの組成: DMEM-F12〔ギブコ(GIBCO)社製〕 163ml、ウシ胎仔血清 30ml (最終濃度15%)、L-グルタミン 2ml (最終濃度2mM)、ペニシリン(100U/ml)ーstreptomycin(100μg/ml) 2ml、非必須アミノ酸溶液〔ギブコ(GIBCO)社製〕 2ml、2-メルカプトエタノール 1ml (最終濃度0.1mM)〕 5mlに懸濁した。得られた細胞懸濁液を、前記フィーダー細胞上に、播種した。なお、培養は、37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下で行なった。また、ES細胞用培地は、2日に1回交換した。

## 【0095】

7日間培養後、古い培地を吸引して、除去し、細胞を、リン酸緩衝化生理食塩水で洗浄した。ついで、ディッシュ上の細胞に、0.25% トリプシン/HBSS (ハンクス平衡塩水溶液) 1mlを添加し、37℃で4~5分間インキュベーションした。その後、常温下でディッシュの底を軽く叩き、細胞のコロニーを剥離させた。

## 【0096】

ついで、前記細胞のコロニーから、前記ES細胞用培地を用いて、5mlピペットによるピペッティングで未分化な細胞のコロニーを回収した。回収された細胞を前記ES細胞用培地に懸濁し、得られた細胞懸濁液 5mlを、6cmディッシュ上のフィーダー細胞に播種した。その後、コロニーの大きさに応じ、2~4日毎に継代した。

## 【0097】

得られた未分化ES細胞を、ヒツジ胎仔への移植に用いた。また、かかる未分化ES細胞を、以下の造血系分化誘導に用いた。

## 【0098】

また、前記未分化ES細胞を、培地〔組成：15% FCS/DMEM-F12〕で培養することにより、胚様体を得た。かかる胚葉体をヒツジへの移植に用いた。

## 【0099】

## 実施例2 サル胚性幹細胞の造血系分化誘導

## (1) フィーダー細胞の作製

マクロファージコロニー刺激因子の機能不全マウスである(C57BL/6×C3H)F2-*o p / o p*マウスの新生仔頭蓋冠より作製されたストロマ細胞株で、前脂肪細胞株であるOP9細胞を、OP9細胞用培地〔1250mlあたりの組成： $\alpha$ -MEM〔ギブコ(Gibco)社製、カタログ番号：12000-022〕980ml、ウシ胎仔血清 250ml (最終濃度20%)、ペニシリン(100U/ml)ーstreptomycin(100 $\mu$ g/ml) 10ml、200mM L-グルタミン溶液 10ml〕で、37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下で培養した。その後、培養液内で接着してコンフルエント又はその直前まで生育した細胞を、リン酸緩衝化生理食塩水で2回洗浄した。ついで、洗浄後のディッシュ上の細胞に、0.1% トリプシン-EDTA (2ml/10cmディッシュ)を添加し、インキュベーターで5分間保温した。

## 【0100】

前記ディッシュに、前記OP9細胞用培地を添加し、細胞を含む培地を50ml コニカルチューブに回収した。回収された細胞を含む培地を1500rpmで5分間遠心分離した。得られた細胞を、前記OP9細胞用培地に、1:4~1:5 (約 $2.5 \times 10^5$ 細胞~ $4 \times 10^5$ 細胞で播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下に、コンフルエントになるまで培養した。

## 【0101】

得られた細胞を、10cmディッシュ〔ファルコン(FALCON)社製〕上、最終濃度10 $\mu$ g/mlのマイトマイシンCを含む前記OP9細胞用培地 10mlで2~4時間培養することにより、細胞の分裂増殖を停止させて、不活化させた。ついで、マイトマイシンCを含む培地を除去した。処理後の細胞をリン

酸緩衝化生理食塩水で洗浄した。洗浄後の細胞をトリプシン・EDTA処理（0.05% トリプシン、1mM EDTA）して、細胞浮遊液を得、ついで、細胞浮遊液を遠心分離して細胞を得た。

#### 【0102】

得られた細胞を、ゼラチンコートした6cm培養ディッシュ〔ファルコン（FALCON）社製、商品名：Tissue Culture Dish〕上、前記OP9細胞用培地 に、1：2（培地あたり約 $1 \times 10^5$ 細胞/ml）で播種した。培養して得られた細胞を、以下の造血系分化誘導培養におけるフィーダー細胞として用いた。

#### 【0103】

##### （2）造血系分化誘導培養

前記実施例1で、0.25% トリプシン/HBSS 1mlに回収されたカニクイザル由来ES細胞株CMK6株及びCMK6/SeV株を、分化用培地〔100mlあたりの組成：IMDM 84ml、8% ウマ血清 8ml、8% ウシ胎仔血清 8ml、 $5 \times 10^{-6}$ M ヒドロコルチゾン 0.18 $\mu$ g、BMP-4 2 $\mu$ g（最終濃度20ng/ml）、SCF 2 $\mu$ g（最終濃度20ng/ml）、IL-3 2 $\mu$ g（最終濃度20ng/ml）、IL-6 1 $\mu$ g（最終濃度10ng/ml）、VEGF 2 $\mu$ g（最終濃度20ng/ml）、G-CSF 2 $\mu$ g（最終濃度20ng/ml）、Flt. 3リガンド 2 $\mu$ g（最終濃度10ng/ml）、EPO 200U（2U/ml）〕 5mlに懸濁し、得られた細胞懸濁液を、前記実施例2（1）で得られた造血系分化誘導培養におけるフィーダー細胞上に1：3で播種した。

#### 【0104】

その後、37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下で6日間培養した。なお、培養中、培地を適宜交換した。得られた細胞を、造血系分化誘導処理細胞として、以下の移植等に用いた（図1）。

#### 【0105】

##### （3）移植用細胞処理

前記実施例2（2）で得られた造血系分化誘導処理細胞のディッシュから、培

地を吸引して、除去し、ディッシュに、0.25% トリプシン/ HBSS 1 ml を添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下、4分間インキュベーションした。

#### 【0106】

ついで、スクレーパー〔商品名: cell scraper-M、スミロン (SUMILON) 社製〕で、フィーダー細胞上の細胞を、フィーダー細胞ごと、前記分化用培地 20 ml の入った 50 ml 容コニカルチューブに回収し、800 rpm、4分間遠心分離した。

#### 【0107】

上清を、吸引し、除去し、細胞を、50 ml 容コニカルチューブ中、前記分化用培地 20 ml に懸濁し、細胞浮遊液を得た。

#### 【0108】

移植直前に、前記細胞浮遊液を、800 rpm で4分間遠心分離した。上清を吸引して、除去し、ついで、得られた細胞に、0.1% BSA/ HBSS 20 ml を添加し、懸濁して、800 rpm で4分間遠心分離することにより、洗浄した、

#### 【0109】

その後、上清を吸引して、除去し、細胞を、0.1% BSA/ HBSS 0.4 ml に懸濁した。得られた懸濁液を、1.5 ml アシストチューブに入れ、氷上で保存した。

#### 【0110】

### 実施例3 細胞移植

実験用ヒツジ取り扱い業者ジャパンラムから購入した妊娠ヒツジを使用した。妊娠約60日目に移植を予定し、移植の1週間～10日前に、移植時における飼育環境に慣れさせた。また、腹部超音波検査による胎仔の確認を行なった。

#### 【0111】

ヒツジ母体を、ケタミン筋注 (15 mg/kg 体重) で麻酔した。ヒツジを、手術台上に仰向けに寝かせ、体位をとって固定後、経口気管内挿管し、自発呼吸のもと O<sub>2</sub>/空気/ハロセンで全身麻酔下に手術を行なった。

## 【0112】

手術は、清潔操作で行なった。下腹部正中切開で開腹後、子宮を腹腔内に翻転させた。

## 【0113】

移植用細胞の注入場所は、胎仔の①腹腔内及び②肝実質内の二通りとした。

## 【0114】

腹腔内への移植の場合、ヒツジの子宮筋層を切開し、温存したまま露出させた卵膜内にヒツジ胎仔を追いつみ、透明な卵膜を通して直視下に胎仔腹腔内に23G針で、実施例1で得られた未分化ES細胞、胚葉体、実施例2で得られた移植用細胞（ $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 細胞）を穿刺注入し、子宮筋層、腹膜筋層、皮膚を層々に縫合閉腹した。また、肝実質内への移植の場合、子宮壁上から超音波ガイド下、ヒツジ胎仔肝実質内に25Gカテラン針で、移植用細胞（ $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 細胞）を穿刺注入し、腹膜筋層、皮膚を層々に縫合閉腹した。

## 【0115】

手術終了後、抗生物質（マイシリン・ゾル）を筋肉内注射した。ついで、抜管し、ヒツジの麻酔覚醒を確認した。

## 【0116】

## 実施例4 胎仔からの試料採取

移植後1ヶ月目の胎仔について、母体全身麻酔下に帝王切開で取り出して解剖し、造血組織を含む全身組織を試料として採取した。

## 【0117】

具体的には、左右の子宮に2頭〔移植胎仔（尾切）、対照胎仔〕ずつ、計4頭の胎仔を妊娠している母体より、以下のような手順で、組織の採取及び処理を同時に行なった。

## 【0118】

採取した組織を以下に示す。

## 内胚葉系組織

1. 肝（胆管、肝実質、肝動脈、門脈領域を含む）
2. 脾頭部（脾管、脾実質）

- 3. 胸腺
- 4. 甲状腺
- 5. 肺(気管支、肺胞)
- 6. 小腸
- 7. 大網 (臓側腹膜)

#### 外胚葉系組織

- 8. 大脳
- 9. 脊髄
- 10. 皮膚(付属器；毛、汗腺、脂腺)
- 11. 尾部切断創(皮膚) [細胞移植した胎仔より採取]

#### 中胚葉系組織

- 12. 脂肪(結合組織)
- 13. 軟骨(骨端軟骨)
- 14. 骨髓
- 15. リンパ節
- 16. 骨格筋
- 17. 心筋
- 18. 大動脈
- 19. 脾臓
- 20. 腎臓
- 21. 生殖腺

なお、初代培養用に下記試料を採取した。

- 22. 末梢血(臍帯動脈血)
- 23. 臍帯血(臍帯静脈血)
- 24. 骨髓(還流後)
- 25. 肝(還流後)

## 26. 腹水(還流後)

## 【0119】

ヒツジ母体に、経口挿管により、自発呼吸、O<sub>2</sub>/空気/ハロセンで麻酔導入を開始した。15分後、母体を帝王切開し、片側子宮の胎仔2頭を取り出し、組織を採取し、処理した。なお、細胞を移植した胎仔(移植胎仔)の体重は、950gであり、対照胎仔の体重は、1040gであった。

## 【0120】

ついで、臍帯が母体とつながった状態で、臍帯静脈血(臍帯血試料)と臍帯動脈血(末梢血試料)とを採血した。ここで、採血量は、移植胎仔の臍帯血試料について、10ml、移植胎仔の末梢血試料について、20ml、対照胎仔の臍帯血試料について、20ml、対照胎仔の末梢血試料について、20mlとした。

## 【0121】

臍帯を切離し、ついで、臍帯静脈に、6Gアトムチューブでカニューレ挿入した。臍帯動脈について、カニューレ挿入ができなかったため、切離断端を開放した。

## 【0122】

臍帯静脈側のカニューレに還流液(冷ラクテック500ml)をつなぎ、点滴にて還流を開始した。臍帯動脈側を脱血路として血液の流出が無くなるまで(全1000ml程度)還流を行なった。

## 【0123】

移植胎仔及び対照胎仔それぞれについて、開腹し、部分肝、大腿骨を初代培養用試料として清潔操作で採取した。また、臓器を摘出した。摘出された臓器を、氷上のシャーレに分けて置いた。

## 【0124】

5mm×5mm×3mmの組織標本を、各3検体ずつ切り出した。そのうち2検体は、4% 緩衝パラホルムアルデヒド(PFA)/8% スクロースの入った15mlサンプル瓶へ入れ、一晚固定を行なった。かかる試料を、4% PFA固定試料とした。

## 【0125】

なお、骨髓試料については、脱灰を行なった。

【0126】

また、前記4% PFA固定試料を、順に、50% エタノール、60% エタノール、70% エタノール、80% エタノール、90% エタノールで1～2時間維持し、100% エタノールで1～2時間維持し、さらに、100% エタノールで1～2時間維持し、さらに100% エタノールで1晩維持することにより脱水し、ベンゼンに浸漬（30分間×2回）させ、ついで、パラフィンに浸漬（45分間×2回）させることにより、4% PFA固定後パラフィン包埋切片試料を得た。

【0127】

残部の1検体は、クリオモルド1号に設置し包埋凍結させた。前記包埋凍結は、OCTコンパウンドで包埋し、液体窒素で凍結させることにより行なった。かかる試料を、新鮮凍結切片用の標本とした。

【0128】

残った臓器から小片をいくつか切り出し、クライオチューブ3本に1つつ入れ、チューブごと液体窒素で凍結させた。これらの臓器の小片を、DNA抽出用又はRNA抽出用の標本とした。

【0129】

また、流産、死産若しくは出生後死亡した場合、胎仔を取り出し、末梢血（ヘパリン採血） 約20ml、骨髓〔ヘパリン生食（10単位/ml）に採取〕適量、臍帯血（ヘパリン採血） 約20ml、肝臓（ヘパリン生食中に採取）約10gを採取し、体表、腹腔内、胸腔内及び脳を剖検し、テラトーマ等の腫瘍形成がないか確認した。腫瘍形成が確認された場合、腫瘍を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで固定した。

【0130】

また、出生後に解析を行なった症例では、出生後からおよそ月に1回のペースで末梢血と骨髓を採取した。具体的には、出生後には、末梢血（ヘパリン採血）約20mlを、最初の数ヶ月間において、2週間毎に採取し、骨髓（ヘパリン生食中に採取）を1ヶ月毎に適量採取した。採取した試料を、無菌コニカルチュ



ープに入れて、室温で振とう保管し、有核細胞を分離し、凍結保存した。

#### 【0131】

肝臓、臍帯血、骨髓、末梢血等の造血系組織や細胞は、溶血法により白血球分画に分離し、DNA抽出用又はRNA抽出用試料、初代培養用試料、FACS解析用試料として凍結保存した。

#### 【0132】

なお、初代培養用試料として、肝臓については、以下のように細胞処理を行なった。試料を無菌操作下で採取し、該試料を適当に細切し、50ml コニカルチューブに回収し、1% トリプシン/EDTA/リン酸緩衝化生理食塩水 20ml を添加し、よく懸濁し、37℃で10分間振盪させながらインキュベーションした。得られた産物に、DNase I 溶液 [10mg DNase I を 1ml 0.15M NaCl に溶解させた溶液] 200 $\mu$ l を添加し、さらに、1M MgCl<sub>2</sub> を 100 $\mu$ l 添加し、37℃で10分間インキュベーションした。その後、産物を、70mm径 ナイロンメッシュ [ファルコン (FALCON) 社製、商品名: cell strainer] でろ過し、産物と同量の D10 培地を添加した。その後、1500rpm で5分間遠心分離し、上清を吸引除去した。なお、赤血球が混入によりペレットが赤色である場合、該ペレットに、約10倍量以上の ACK lysing buffer を添加し、15~0分間氷上で維持し、ついで、1500rpm で5分間4℃で遠心分離した。約40ml のリン酸緩衝化生理食塩水で、ペレットを2回洗浄した。上清を、吸引して、除去し、得られたペレットを、10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>細胞/バイアルでセルバンカーに懸濁し、-80℃で凍結保存した。

#### 【0133】

また、初代培養用試料として、臍帯血、末梢血及び骨髓については、以下のように細胞処理を行なった。試料を、ヘパリン採血に順じて無菌操作で採取し、血液 35ml を 50ml コニカルチューブに入れ、1500rpm、10分間遠心分離した。血漿を、吸引して、除去し、ペレットを、50ml コニカルチューブ5本に分注した。ついで、各コニカルチューブに、40ml (ペレットの約10倍量) の ACK lysing buffer を添加し、混和させ、氷上

で、15分間インキュベーションした。1500rpmで5分間、4℃での遠心分離後、上清を吸引して、除去した。なお、ペレットが赤色である場合、1500rpm、10分間遠心分離を繰り返した。ついで、ペレットに、リン酸緩衝化生理食塩水 40mlを添加し、懸濁し、それぞれのチューブを1本のチューブにまとめ、1500rpmで5分間、4℃で遠心分離することにより洗浄を行なった。かかる洗浄を、2回行なった。上清を吸引除去し、ペレットを $5 \times 10^6$ 細胞/バイアル/mlとなるようにセルバンカーで懸濁し、凍結保存した。

#### 【0134】

##### 実施例5 各組織由来のゲノムDNAの解析

前記実施例4で得られた試料から商品名: QIAamp DNA Mini Kit及び商品名: QIAamp DNA Blood Mini Kitを用いて、キットに添付の製造者のプロトコールに従い、DNAを抽出した。

#### 【0135】

サル由来の細胞を移植したヒツジ胎仔の解析のために、サル $\beta 2$ -ミクログロブリンに対するプライマー対として、外部プライマー対:

CB2MG-2F: 5'-GTCTGGATTTTCATCCATCTG-3' (配列番号: 1) と h

B2MG 5R: 5'-GGCTGTGACAAAGTCACATGG-3' (配列番号: 2) とか

らなるプライマー対、及び

内部プライマー対:

CB2MG-2F: 5'-GTCTGGGTTTCATCCATCCG-3' (配列番号: 3) と h

B2MG-3R: 5'-GGTGAATTCAGTGTAGTACAA G-3' (配列番号: 4) と

からなるプライマー対

を用い、前記DNAを鋳型として、半定量的PCRを行なった。なお、PCR条件は、反応液〔組成:  $H_2O$  30.75 $\mu$ l、 $10 \times$ PCR緩衝液 5 $\mu$ l、dNTP (各2.5mM) 4 $\mu$ l、Ex Taq (5U/ $\mu$ l) 0.25 $\mu$ l、プライマー (各10pM) 各2.5 $\mu$ l、試料由来DNA (250ng相当量) 5 $\mu$ l〕を用い、95℃で5分間のインキュベーションの後、95℃で1分間と58℃で1分間と72℃で1分間とを1サイクルとして、外部増幅時には、25サイクル、内部増幅時には、30サイクルを行ない、72℃で5分間イ

ンキュベーションして、4℃で維持する条件とした。

### 【0136】

また、 $\beta$ -アクチンに対するプライマー対：

C $\beta$ 1：5' -CATTGTCATGGACTCTGGCGACGG-3' (配列番号：5) と

C $\beta$ 2：5' -CATCTCCTGCTCGAAGTCTAGGGC-3' (配列番号：6) と

からなるプライマー対を用い、同様にPCRを行なった。

### 【0137】

なお、定量のために、下記表1に示す希釈系列の試料を作製し、用いた。

### 【0138】

【表1】

| No.         | 9     | 8    | 7    | 6    | 5     | 4      | 3       | 2    | 1                       |
|-------------|-------|------|------|------|-------|--------|---------|------|-------------------------|
| 希釈倍率        | 100%  | 10%  | 1%   | 0.1% | 0.01% | 0.001% | 0.0001% | 0%   | H <sub>2</sub> O (n.c.) |
| サル DNA      | 100ul | 10ul | 10ul | 10ul | 10ul  | 10ul   | 10ul    | —    | —                       |
| ヒツジ DNA     | —     | 90ul | 90ul | 90ul | 90ul  | 90ul   | 90ul    | 90ul | —                       |
| Ttotal (ul) | 90ul  | 90ul | 90ul | 90ul | 90ul  | 90ul   | 90ul    | 90ul | —                       |

### 【0139】

また、ヒト臍帯血CD34+細胞を移植したヒツジ胎仔を対照として用いた。

このとき、 $\beta$ 2-ミクログロブリンに対するプライマー対として、外部プライマー対：

hB2MG-2F 5' -GTCTGGATTTCATCCATCTG-3' (配列番号：7) と前

記hB2MG 5Rとからなるプライマー対、及び

内部プライマー対：

hB2MG-2F 5' -GTCTGGGTTTCATCCATCCG-3' (配列番号：3と同じ)

)と前記hB2MG-3Rとからなるプライマー対を用い、前記DNAを鋳型と

して、半定量的PCRを行なった。なお、PCR条件は、反応液〔組成：H<sub>2</sub>O

30.75  $\mu$ l、10×PCR緩衝液 5  $\mu$ l、dNTP (各2.5 mM)

4  $\mu$ l、商品名：Ex Taq (5 U/ $\mu$ l) 0.25  $\mu$ l、プライマー (

各10 pM) 各2.5  $\mu$ l、試料由来DNA (250 ng相当量) 5  $\mu$ l〕

を用い、95℃で5分間のインキュベーションの後、95℃で1分間と58℃で

1分間と72℃で1分間とを1サイクルとして、外部増幅時には、25サイクル

、内部増幅時には、30サイクルを行ない、72℃で5分間インキュベーションして、4℃で維持する条件とした。

【0140】

なお、定量のために、下記表2に示す希釈系列の試料を作製し、用いた。

【0141】

【表2】

| No.        | 9     | 8    | 7    | 6    | 5     | 4      | 3       | 2    | 1                       |
|------------|-------|------|------|------|-------|--------|---------|------|-------------------------|
| 希釈倍率       | 100%  | 10%  | 1%   | 0.1% | 0.01% | 0.001% | 0.0001% | 0%   | H <sub>2</sub> O (n.c.) |
| ヒト DNA     | 100ul | 10ul | 10ul | 10ul | 10ul  | 10ul   | 10ul    | —    | —                       |
| ヒツジ DNA    | —     | 90ul | 90ul | 90ul | 90ul  | 90ul   | 90ul    | 90ul | —                       |
| Total (ul) | 90ul  | 90ul | 90ul | 90ul | 90ul  | 90ul   | 90ul    | 90ul | —                       |

【0142】

PCRにより生成した産物を、2% アガロースゲル (0.01% EtBr 含有) による電気泳動に供した。

【0143】

その結果、ヒト臍帯血CD34+細胞 (対照群) をヒツジ胎仔の肝実質内に移植後、約4ヶ月の個体の末梢血からのみ0.01%未満のキメラ率でサル由来のβ2-ミクログロブリンの塩基配列が検出された。

【0144】

実施例6 造血系組織及び細胞のコロニーアッセイ及びコロニー解析

初代培養用に分離した細胞で造血コロニーアッセイを行なった。

【0145】

凍結保存されていた細胞のクライオチューブを37℃の恒温槽で溶解し、9mlの2% FBS-IMDMを入れた15ml コニカルチューブ中に懸濁し、得られた懸濁液の一部を用いて細胞数を計数した。ついで、懸濁液を、1300rpmで4分間遠心分離し、得られたペレットを、2% FBS-IMDMで $1 \times 10^6$ 細胞/mlとなるように懸濁し、細胞浮遊液を得た。さらに、2% FBS-IMDMで10倍希釈して、 $1 \times 10^5$ 細胞/mlの細胞浮遊液を調製した。

。

【0146】

14mlのポリスチレン丸底チューブに、商品名：Methocult GF + [ステムセルテクノロジーズ (StemCell Technologies) 社製、カタログ番号：ST-04435] を4ml入れ、細胞浮遊液を400  $\mu$ l 添加し、キャップを閉めて激しく振って攪拌した。その後、泡が消えるまで約5分間静置した。

【0147】

ついで、得られた細胞を含む培地 1.1mlを、18G針を付けた2.5ml 注射器で、3.5mm ディッシュの中央に注入し、ディッシュの底に均一に広げた。

【0148】

15cm ペトリ皿に、3.5cm ディッシュを6枚と、リン酸緩衝化生理食塩水 3mlを含む 3.5cm ディッシュを保湿用として入れ、37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下でインキュベーションした。

【0149】

コロニーの計数は、インキュベーション開始から、14日目に行なった。

【0150】

しかしながら、かかる方法では、サル由来の造血前駆細胞だけでなくヒツジ由来の造血前駆細胞もコロニーを形成していることがわかった。

【0151】

そこで、コロニーを形成している培地からコロニーを取り、各コロニーからDNAを抽出し、得られたDNAを鋳型とし、サル $\beta$ 2-ミクログロブリンに対するプライマー対を用いて、PCRを行ない、サル由来の造血前駆細胞の存在を確認した。

【0152】

サル $\beta$ 2-ミクログロブリンに対するプライマー対として、外部プライマー対：前記CB2MG-2FとhB2MG 5Rとからなるプライマー対、及び内部プライマー対：前記CB2MG-2FとhB2MG-3Rとからなるプライマー対を用い、前記DNAを鋳型として、PCRを行なった。なお、PCR条件は、反応液〔組成：H<sub>2</sub>O 30.75  $\mu$ l、10×PCR緩衝液 5  $\mu$ l、

dNTP (各2.5mM) 4 $\mu$ l、商品名: Ex Taq (5U/ $\mu$ l) 0.25 $\mu$ l、プライマー (各10pM) 各2.5 $\mu$ l、試料由来DNA (250ng相当量) 5 $\mu$ l] を用い、95℃で5分間のインキュベーションの後、94℃で30秒間と57℃で1分間と72℃で1分間とを1サイクルとして、外部増幅時及び内部増幅時ともに、25サイクルを行ない、72℃で5分間インキュベーションして、4℃で維持する条件とした。得られた産物について、2% アガロースゲルによる電気泳動により解析した。

### 【0153】

その結果、造血系分化誘導サルES細胞を用いた場合、図2に示されるように、造血系分化誘導処理をしたES細胞を腹腔内に移植後1ヶ月の個体の胎仔肝臓で約30% (n=1) であり、造血系分化誘導処理をしたES細胞を肝実質内に移植した出生後 (移植後3~6ヶ月) の個体の骨髄で約1% (n=3) の頻度でサル由来の造血コロニーがあることがわかった。すなわち、ES細胞を、造血系分化誘導処理し、ヒツジ胎仔に導入することにより、該ヒツジ胎仔は、サル由来の造血系細胞を産生することがわかった。

### 【0154】

実施例7 キメラ率に対するサイトカインの効果の検討

組換えヒト幹細胞因子 [recombinant human stem cell factor (rhSCF)、1.5mg/ml、アムジェン社製 ロット番号15701F4] 1000 $\mu$ gを希釈溶媒 [組成: HBSS中、10% ヒツジ自己血清及び0.1U ヘパリンナトリウム] 5mlで希釈し、得られた希釈物を、0.22 $\mu$ mフィルターで濾過し、出生後の骨髄コロニーPCRでサル/ヒツジキメラを認めた個体 (n=2) に対し、60 $\mu$ g/kg/日となるように、23G針付注射器を用いて、1日1回、18日間腹腔内注射した。

### 【0155】

投与対象のヒツジNo: 141は、生後81日 (移植後156日) であり、投与開始時点で体重約14kgであった。また、投与対象のヒツジNo: 182は、生後12日 (移植後94日) であり、投与開始時点で体重約10kgであった。

### 【0156】

投与6日目、最終投与から1日後及び最終投与から3日後のそれぞれにおいて、末梢血及び骨髓を採取した。

【0157】

得られた末梢血及び骨髓から実施例3の記載と同様に、溶血法により、白血球分化画に分離した。

【0158】

ついで、各細胞に、FACS緩衝液〔組成：5% ウシ胎仔血清、と0.05%  $\text{NaN}_3$ とを含むリン酸緩衝化生理食塩水〕 3mlを添加して、懸濁し、得られた懸濁物を70  $\mu\text{m}$  メッシュを通した。得られた産物を1500rpm (490×g)で、4分間遠心分離し、上清を吸引除去した。その後、得られたペレットに前記FACS緩衝液 450  $\mu\text{l}$  添加した。

【0159】

96ウェルプレートに、得られた溶液 150  $\mu\text{l}$  ずつを分注した。なお、前記溶液のうち150  $\mu\text{l}$  に前記FACS緩衝液 350  $\mu\text{l}$  を添加し得られた試料を抗体陰性対照として用いた。

【0160】

ついで、96ウェルプレートのウェル中の溶液を1800rpm (710×g)で、2分間遠心分離し、上清を除去した。

【0161】

その後、商品名：PE-Anti-human CD45 (ベクトン ディッキンソン社製、BDカタログ番号：557059) 20  $\mu\text{l}$  と前記FACS緩衝液 80  $\mu\text{l}$  とを、ウェルに添加した。なお、前記PE-Anti-human CD45の代わりに、アイソタイプ対照として、商品名PE-Anti-mouse IgG1 $\kappa$  (ベクトン ディッキンソン社製、カタログ番号：33815X)を用いた。得られた混合物を、30分間氷上でインキュベーションした後、1800rpm (710×g)で、2分間遠心分離し、上清を除去した。その後、得られたペレットを、前記FACS緩衝液 150  $\mu\text{l}$  で2回洗浄した。

【0162】

得られたペレットを前記FACS緩衝液 350  $\mu\text{l}$  で懸濁し、得られた試料

をフローサイトメトリーに供した。

【0163】

その結果、CD45+細胞は見出されなかった。

【0164】

また、前記末梢血及び骨髓を、前記実施例4と同様に処理し、得られた各試料から、商品名：QIAamp DNA Mini Kit及び商品名：QIAamp DNA Blood Mini Kitを用いて、キットに添付の製造者のプロトコールに従い、DNAを抽出した。ついで、前記DNAを鋳型とし、サルβ2-ミクログロブリンに対するプライマー対として、前記CB2MG-2FとhB2MG 5Rとを外部プライマー対とし、前記CB2MG-2FとhB2MG-3Rとを内部プライマー対として用いて、PCRを行なった。なお、PCR条件は、反応液〔組成：H<sub>2</sub>O 30.75μl、10×PCR緩衝液 5μl、dNTP（各2.5mM） 4μl、商品名：Ex Taq（5U/μl） 0.25μl、プライマー（各10pM） 各2.5μl、試料由来DNA（250ng相当量） 5μl〕を用い、95℃で5分間のインキュベーションの後、95℃で1分間と58℃で1分間と72℃で1分間とを1サイクルとして、外部増幅時には、25サイクル、内部増幅時には、30サイクルを行ない、72℃で5分間インキュベーションして、4℃で維持する条件とした。PCRにより生成した産物を、2% アガロースゲル（0.01% EtBr含有）による電気泳動に供しし、観察した。結果を図3の上段パネルに示す。ついで、ゲル上のDNAをPVDF膜（アマシャムファルマシア社製）に転写後、得られた膜と、配列番号：3に示される塩基配列又は配列番号：4に示される塩基配列を有するプローブとを用いて、サザンブロットハイブリダイゼーションを行なった。結果を図3の下段パネルに示す。

【0165】

なお、対照として、下記DNA：  
ヒツジDNAのみ（図3中、レーン4）、  
0.0001% サルDNAと99.9999% ヒツジDNAとの混合物（図3中、レーン5）



0.001% サルDNAと99.999% ヒツジDNAとの混合物 (図3中、レーン6)

0.01% サルDNAと99.99% ヒツジDNAとの混合物 (図3中、レーン7)

0.1% サルDNAと99.9% ヒツジDNAとの混合物 (図3中、レーン8)

1% サルDNAと99.9% ヒツジDNAとの混合物 (図3中、レーン9)

10% サルDNAと90% ヒツジDNAと混合物 (図3中、レーン10) 及び

サルDNA単独 (図3中、レーン11)

のそれぞれ 250 ng相当量について、検体試料と同様の条件で同時にPCRを行ない、その産物の電気泳動に用いた。

#### 【0166】

その結果、図3より、投与6日目の末梢血、投与後1日、3日、40日の骨髓において、約0.01%のキメラ率であることが示された。

#### 【0167】

さらに、末梢血及び骨髓のそれぞれから、前記実施例4と同様の手法により、初代培養用試料を調製した。得られた初代培養用試料を、MethoCult GF+ (Stem Cell Technologies社製) 14日間培養した。

#### 【0168】

得られたコロニーを取り、各コロニーからDNAを抽出した。得られたDNAを鋳型とし、前記と同様のサル $\beta$ 2-ミクログロブリンに対するプライマー対を用いて、PCRを行なった。結果を表3に示す。

#### 【0169】

#### 【表3】



| ヒツジNo. | BM No.  | 1          | 2          | 3           | 4           | 5          | 6           | 7           | 8          | 9 | 10         | 11      |
|--------|---------|------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|---|------------|---------|
| 141    | 採取日     | 12.4.02    |            | 1.10.03     | 2.5.03      | 2.15.03    | 2.28.03     | 3.2.03      | 4.9.03     |   | 5.26.03    | 7.17.03 |
|        | 移植後日数   | 88         |            | 125         | 151         | 161(SCFd6) | 174(SCFd19) | 176(SCFd21) | 214        |   | 261        | 288     |
|        | %陽性 CFU | 1.1%(1/91) |            | 0%(0/91)    | 1.1%(1/91)  | 3.3%(3/91) | 4.4%(4/91)  | 3.3%(3/91)  | 5.5%(5/91) |   | 6.6%(6/91) |         |
| 182    | 採取日     | 6.4.03     | 6.10.03    | 6.23.03     | 6.25.03     | 7.17.03    |             |             |            |   |            |         |
|        | 移植後日数   | 93         | 99(SCFd6)  | 112(SCFd19) | 114(SCFd21) | 136        |             |             |            |   |            |         |
|        | %陽性 CFU | 1.6%(1/63) | 3.6%(3/83) | 4.7%(3/64)  | 2.2%(2/91)  | 0%(0/91)   |             |             |            |   |            |         |

## 【0170】

その結果、表3に示されるように、ヒト幹細胞因子投与前の場合と比べて、キメラ率が、3～4倍に上昇した。

## 【0171】

配列表フリーテキスト

配列番号：1は、プライマーCB2MG-2Fの配列である。

## 【0172】

配列番号：2は、プライマーhB2MG 5Rの配列である。

## 【0173】

配列番号：3は、プライマーCB2MG-2FCB又はhB2MG-2Fの配列である。

## 【0174】

配列番号：4は、プライマーhB2MG-3Rの配列である。

## 【0175】

配列番号：5は、プライマーC $\beta$ 1の配列である。

## 【0176】

配列番号：6は、プライマーC $\beta$ 2の配列である。

## 【0177】

配列番号：7は、プライマーhB2MG-2Fの配列である。

## 【0178】

## 【発明の効果】

本発明の霊長類動物の胚性幹細胞からの造血系細胞への分化方法によれば、霊長類の造血系細胞を安定に供給することができ、霊長類動物の胚性幹細胞への外来遺伝子の導入等の遺伝子工学的操作を行なうことなく、該霊長類動物の胚性幹細胞を造血系細胞に分化させることができ、霊長類動物の個体にとって異種動物において、該個体にとって同種である造血系細胞を得ることができるという優れた効果を奏する。また、本発明の霊長類動物の造血系細胞の製造方法によれば、霊長類の造血系細胞を安定に供給することができ、霊長類の造血系細胞を大量に供給することができ、霊長類動物の個体にとって異種動物において、該個体にとって同種である造血系細胞を得ることができ、霊長類動物の輸血用血小板を安定

に供給することができ、霊長類動物の衣装供養のCD34+細胞を安定に供給することができるという優れた効果を奏する。また、本発明の霊長類の造血系細胞を産生するキメラヒツジの作製方法によれば、霊長類の造血系細胞を安定に供給することができるキメラヒツジを得ることができるという優れた効果を奏する。

【0179】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TANABE SEIYAKU CO., LTD.

<120> A method for differentiating a primate embryonic stem cell into a hemopoietic cell

<130> TB-15-003

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence of primer CB2MG-2F

<400> 1

gtctggattt catccatctg 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence of primer hB2MG 5R

<400> 2

ggctgtgaca aagtcacatg g 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence of a primer CB2MG-2FCB or hB2MG-2F, or a probe for detecting beta 2- microgloblin

<400> 3

gtctgggttt catccatccg 20

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence of a primer hB2MG-3R, or a probe for detecting beta 2-microglobulin

<400> 4

ggtgaattca gtgtagtaca ag 22

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence of primer C betal

<400> 5

cattgtcatg gactctggcg acgg 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence of primer C beta2

<400> 6

catctcctgc tcgaagtcta gggc 24

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence of primer hB2MG-2F

<400> 7

gtctggattt catccatctg 20

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

図 1 は、霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞を示す。パネル (A) は、未分化胚性幹細胞を示し、スケールバーは、 $100\mu\text{m}$ を示す。パネル (B) は、OP9細胞上BMP-4の存在下での培養時の細胞のシェーマを示す。パネル (C) は、胚性幹細胞を、造血系分化誘導条件に維持して得られた細胞を示し、スケールバーは、 $100\mu\text{m}$ を示す。

##### 【図 2】

図 2 は、移植後に得られたヒツジ胎仔において、サルβ2-ミクログロブリンを検出した結果を示す図である。図中、パネル (A) は、胎仔肝臓、パネル (B) は、骨髄の結果を示す。

##### 【図 3】

図 3 は、末梢血又は骨髄におけるサルβ2-ミクログロブリンを検出した結果を示す図である。上段パネルは、PCRの結果、下段パネルは、サザンブロットハイブリダイゼーションの結果を示す。図中、Mは、分子量マーカー、レーン1～3は、陰性対照 (水)、レーン4は、ヒツジDNA単独、レーン5～10は、それぞれ、0.0001%、0.001%、0.01%、0.1%、1%及び10

% サルDNA、レーン11は、サルDNA単独、レーン12は、試料無し、レーン13～レーン17は、それぞれ、投与前、投与6日目、投与後1日、投与後3日及び投与後40日の末梢血由来試料、レーン18～22は、それぞれ、それぞれ、投与前、投与6日目、投与後1日、投与後3日及び投与後40日の骨髓由来試料を示す。

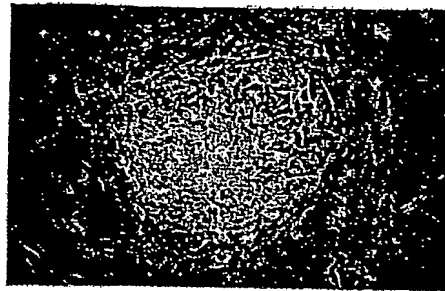


【書類名】

図面

【図 1】

(A)

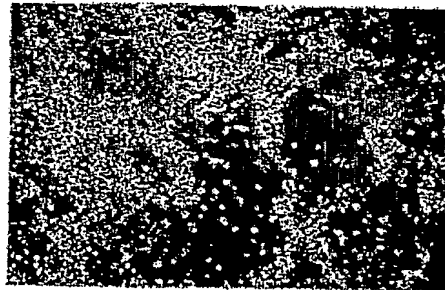


100  $\mu$ m

(B)

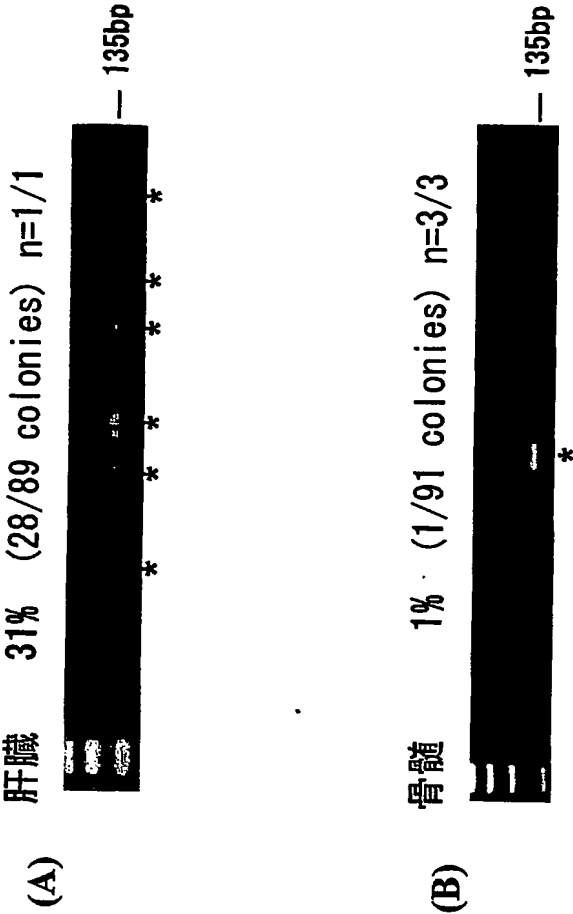


(C)

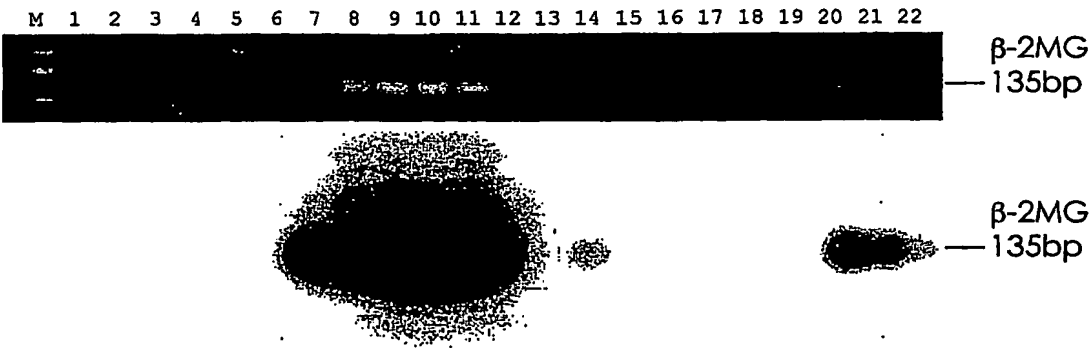


100  $\mu$ m

【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

霊長類動物の造血系細胞、分化細胞等の供給のための技術を提供すること。

【解決手段】

霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞を妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、ついで、出生したヒツジ胎仔から霊長類動物の造血系細胞を得る、霊長類動物の胚性幹細胞から造血系細胞への分化方法；マクロファージコロニー刺激因子を欠損したストロマ細胞株をフィーダー細胞とし、該フィーダー細胞上、霊長類動物の胚性幹細胞を維持し、得られた霊長類動物由来の細胞を、妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植し、該胎仔を出生にいたるまで生育させ、出生した胎仔より、該霊長類動物の胚性幹細胞から分化した霊長類動物の造血系細胞を分離する、霊長類動物の造血系細胞の製造方法；該製造方法により得られる造血系細胞；並びに霊長類動物の胚性幹細胞を、造血系細胞の分化誘導に適した条件で維持し、得られた細胞を妊娠ヒツジの子宮内の胎仔に移植する、霊長類動物の造血系細胞を生産するキメラヒツジの作製方法。

【選択図】 なし

【書類名】 先の出願に基づく優先権主張取下書  
【整理番号】 TB-15-003  
【提出日】 平成15年11月 7日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
    【出願番号】 特願2003-208724  
    【出願日】 平成15年 8月25日提出の特許願  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000002956  
    【氏名又は名称】 田辺製薬株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100095832  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 細田 芳徳  
【先の出願の表示】  
    【出願番号】 特願2003-153494  
    【出願日】 平成15年 5月29日

特願 2003-208724

出願人履歴情報

識別番号

[000002956]

1. 変更年月日

1990年 9月20日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号

氏 名

田辺製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**